

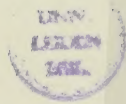
Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Reaktivierung der menschlichen Serum-Paraoxonase nach Hemmung mit EDTA

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Werner Heinrich
aus Abensberg/Ndb.

1983



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Professor Dr. H.-B. Wuermeling

Reaktivierung der menschlichen Serum-Paraoxonase nach Hemmung mit EDTA

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen - Nürnberg

vorgelegt von
Werner Heinrich
aus Abensberg/Ndb.

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr. F. Wolf
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling
Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.1983

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	5
II. Aufgabenstellung	11
III. Eigene Untersuchungen	14
1. Blutentnahme	14
2. Metallionen zur Reaktivierung der Paraoxonase	14
3. Methodik	15
3.1. Reagenzien	16
3.2. Herstellung der Lösungen	16
3.3. Messung	17
3.4. Berechnung	18
4. Versuche zur Reaktivierung der menschlichen Serumparaoxonase	20
4.1. Reaktivierung mittels Calcium-Lösungen	21
4.1.1. Reaktivierung eines Serums (Serum G) mit Ca^{++} -Lösungen	21
4.1.1.1. Zeitlicher Verlauf der Reaktivierungsversuche mit verschiedenen konzentrierten Ca^{++} -Lösungen	21
4.1.1.2. Reaktivierung der Paraoxonase in Abhängigkeit von der Einwirkzeit des EDTA	23
4.1.1.3. Reaktivierungsversuche bei höherer Temperatur	25
4.1.2. Reaktivierung der Seren aller zehn Probanden mit $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Ca}^{++}$	27
4.1.2.1. Reaktivierung mit $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Ca}^{++}$ -Lösung	27
4.1.2.2. Reaktivierung der Seren aller zehn Probanden in Abhängigkeit von der Einwirkzeit des EDTA	30

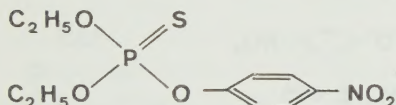
	Seite
4.2. Reaktivierung mittels anderer Metall- ionen	33
4.2.1. Reaktivierung eines Serums (Serum G) mit sieben weiteren Me- tallionen	33
4.2.2. Reaktivierung aller zehn Seren mit- tels Zn^{++} und Mn^{++}	36
5. Weitere Untersuchungen	40
5.1. Sofortige Ca^{++} -Zugabe nach der Blutent- nahme	40
5.2. Verwendung von Heparin statt EDTA als Gerinnungshemmer	42
IV. Diskussion	45
V. Zusammenfassung	47
VI. Literaturverzeichnis	49

I. EINLEITUNG:

Der Name Alkylphosphate oder organische Phosphorsäureester wird oft in Zusammenhang mit Mord- oder Selbstmordfällen genannt. Besonders das E 605 (siehe Abbildung 1) hat hierbei eine gewisse Berühmtheit erlangt.

Abbildung 1:

E 605 = Parathion = Nitrostigmin = O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl)-thiophosphat



Chemisch gesehen handelt es sich bei den Alkylphosphaten um Ester oder Amide der Phosphorsäure, Phosphonsäure oder Phosphinsäure.

Das Hauptanwendungsgebiet dieser Verbindungen liegt im Pflanzenschutz und in der Schädlingsbekämpfung, wo es vor allem bei unsachgemäßem Gebrauch zu schweren Vergiftungen kommen kann. Durch ihre gute Lipidlöslichkeit werden die Alkylphosphate sehr rasch resorbiert, wobei die Aufnahme in den Körper über die Atemwege (nach Versprühen der Insektizide), über den Magen-Darm-Trakt (Mord, Selbstmord, akzidentell) oder über die Haut geschehen kann.

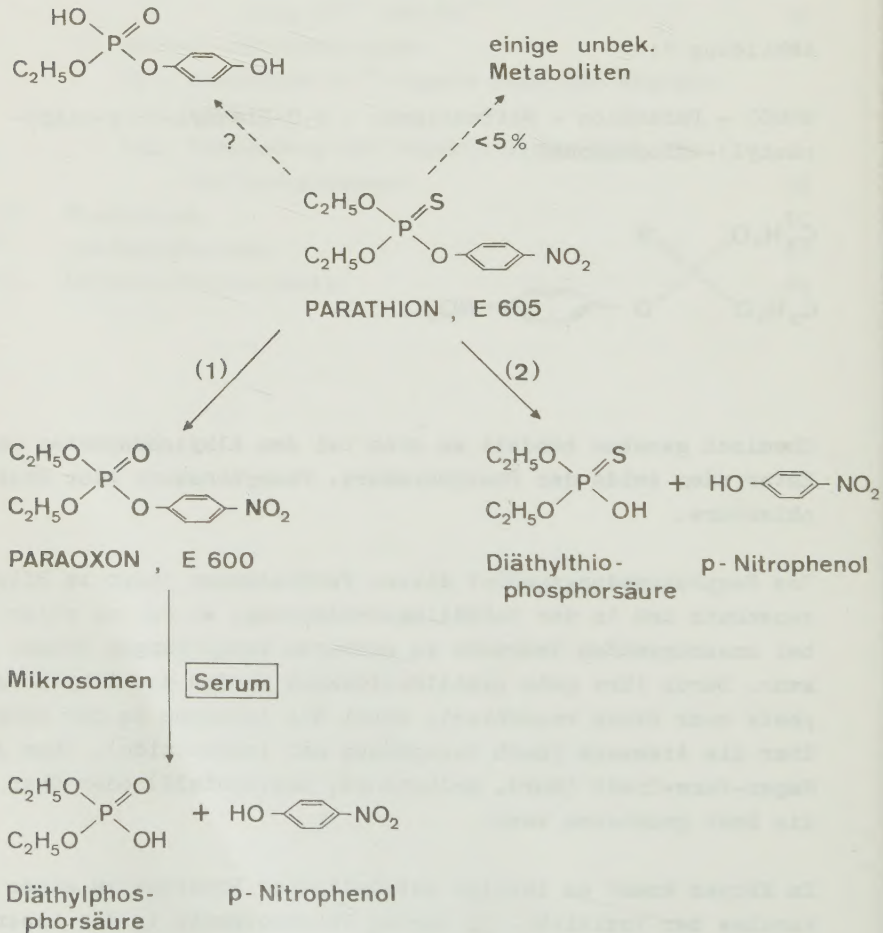
Im Körper kommt es infolge metabolischer Prozesse zu einer Zunahme der Toxizität. So werden Thiophosphate in der Leber durch Mikrosomenfermente oxydiert; die kaum wirksame Verbindung Parathion (E 605) wird in das hochgiftige Paraoxon



(E 600) umgewandelt (siehe Abbildung 2).

Abbildung 2:

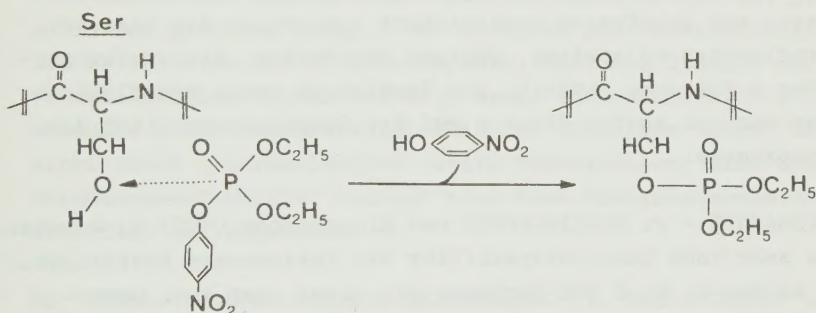
Stoffwechsel von PARATHION im Warmblüter



Die Wirkungsweise von Paraoxon wie auch der anderen Alkylphosphate beruht auf einer nahezu irreversiblen Hemmung der Cholinesterase: Das elektrophile Phosphoratom des Paraoxons reagiert mit dem elektronenreichen nukleophilen Sauerstoffatom des Serins im katalytischen Zentrum der Acetylcholinesterase. Unter Abspaltung von p-Nitrophenol bildet sich rasch und weitgehend irreversibel ein Alkylphosphat-Enzymkomplex, der nicht mehr in der Lage ist, Acetylcholin zu spalten (siehe Abbildung 3).

Abbildung 3:

Bildung des Alkylphosphat-Enzymkomplexes



Die Vergiftungssymptome entsprechen somit denen einer "inneren Acetylcholinvergiftung". Sie lassen sich untergliedern in muskarinartige (Angriff an parasympathischen Nervenendigungen) und nikotinartige Wirkungen (vegetative Ganglien und neuromuskuläre Endplatte). Die muskarinartigen Symptome (Tränen- und Speichelfluß, erhöhte Bronchialsekretion, Koliken, Durchfälle, Erbrechen, Miosis etc.) überwiegen, sind aber seltener die Ursache des Todes, der meist infolge von zentraler und/oder peripherer Atemlähmung eintritt, unter Umständen schon nach wenigen Minuten.

Trotz der hohen akuten Toxizität ist E 605 - wie alle anderen Alkylphosphate auch - biologisch abbaubar und wird weder innerhalb noch außerhalb der Organismen gespeichert.

Das Serum vieler Warmblüter enthält, wie ALDRIDGE (1953 b) feststellte, ein Enzym, welches Paraoxon hydrolysiert. Er nannte es folgerichtig E-600-Esterase oder Paraoxonase. Irrtümlicherweise hielt er das neu entdeckte Enzym für identisch mit der sogenannten A-Esterase, die dadurch charakterisiert ist, daß sie durch Paraoxon oder andere organische Phosphorsäureester nicht gehemmt wird und p-Nitrophenylacetat, Propionat und Butyrat spaltet (ALDRIDGE, 1953 a).

MAIN (1960 a, b) konnte zeigen, daß 85 - 90 % reine Paraoxonase - aus Schafserum angereichert - nicht in der Lage ist, Phenylacetat zu spalten, während Schafserum, das erwiesenermaßen A-Esterase enthält, die Verbindung rasch hydrolysiert. Dies war ein erster Hinweis auf die Substratspezifität der Paraoxonase.

GELDMACHER - v. MALLINCKRODT und Mitarbeiter (1973 b) konnten die sehr hohe Substratspezifität der Paraoxonase bestätigen. So werden z. B. E 600-Derivate mit einer oder zwei unveresterten Hydroxylgruppen am Phosphoratom nicht hydrolysiert.

In seiner Arbeit über die enzymatische Hydrolyse von E 600 durch menschliches Serum gab KRISCH (1968) einige weitere Charakteristika der Paraoxonase an:

- Michaeliskonstante (k_m) $2,5 - 5,7 \cdot 10^{-4}$
- pH-Optimum pH 11,0 - 11,6
- Inhibitoren

- a) typische B-Esterase-Inhibitoren bleiben ohne Wirkung
- b) Hemmbarkeit durch Chelatbildner, insbesondere EDTA

Ferner fand KRISCH bei seinen Untersuchungen, daß man die Testpersonen in zwei sich überlappende Gruppen mit unter-

schiedlicher Enzymaktivität einteilen konnte. Ob die Ursache hierfür in quantitativen Unterschieden des gleichen Enzymproteins oder in zwei qualitativ verschiedenen Enzymen liegt, vermochte er nicht zu sagen. Die Aktivitätsunterschiede könnten auch genetisch bedingt sein, wie das Beispiel der Pseudocholinesterase zeigt.

Während bei KRISCH eine sichere Zuordnung der Seren in eine der beiden Gruppen aufgrund des relativ großen Überlappungsbereiches nicht möglich war, fanden GELDMACHER - v. MALLINCKRODT und Mitarbeiter (1969) mit der Anti-Cholinesterase-Technik eine gute Möglichkeit zur Trennung von Seren mit unterschiedlich aktiver Paraoxonase:

Nach Inkubation menschlicher Serum-Cholinesterasen mit jeweils der gleichen Menge E 600 stellten sie unterschiedliche Restaktivitäten der Cholinesterasen fest. Die Ursache der unterschiedlichen Restaktivitäten waren unterschiedlich wirksam werdende E 600-Konzentrationen in den einzelnen Seren, bewirkt durch unterschiedlich aktive Paraoxonasen. Eine hohe Paraoxonase-Aktivität bedingt eine hohe Cholinesterase-Restaktivität und umgekehrt.

Mit dieser Methode konnten GELDMACHER - v. MALLINCKRODT und Mitarbeiter drei gut getrennte Gruppen darstellen und deren Verteilung in der Bevölkerung untersuchen.

Tabelle 1:

Einteilung der Paraoxonase-Gruppen mittels der Anti-Cholin-
esterase-Technik

Gruppe	Restaktivität der Cholin- esterase in Prozent der Normalaktivität	Aktivität der Paraoxonase	Verteilung in der Bevölkerung in Prozent
I	0 - 5 %	niedrig	60 %
II	11 - 22 %	mittel	34 %
III	29 - 51 %	hoch	6 %

Auch in weiteren Arbeiten konnte der Polymorphismus der Paraoxonase, d. h. die Einteilung in drei Gruppen aufgrund der verschiedenen Aktivitäten, bestätigt werden. Untersuchungen von Familien ließen vermuten, daß er genetisch bedingt ist und möglicherweise einem intermediären, nicht geschlechtsgebundenen Erbgang folgt (GELDMACHER - v. MALLINCKRODT und Mitarbeiter, 1973 a; DUMBACH, 1976; GELDMACHER - v. MALLINCKRODT und Mitarbeiter, 1979).

II. AUFGABENSTELLUNG:

Die Ca^{++} -Abhängigkeit der Paraoxonase, die schon KRISCH (1968) aufgrund seiner Ergebnisse vermutete, konnte durch Arbeiten von HARTL (1978) und HECHTEL (1980) bestätigt werden.

HARTL bewies die Aktivierbarkeit der Paraoxonase durch Ca^{++} -Zugabe. Er fand im Gegensatz zu KRISCH, der eine generelle Aktivitätssteigerung von 40 % feststellte, gruppenspezifische Unterschiede gemäß der trimodalen Aktivitätsverteilung. Lediglich bei der Gruppe mit niedriger Paraoxonase-Aktivität stimmten die Ergebnisse von KRISCH und HARTL überein.

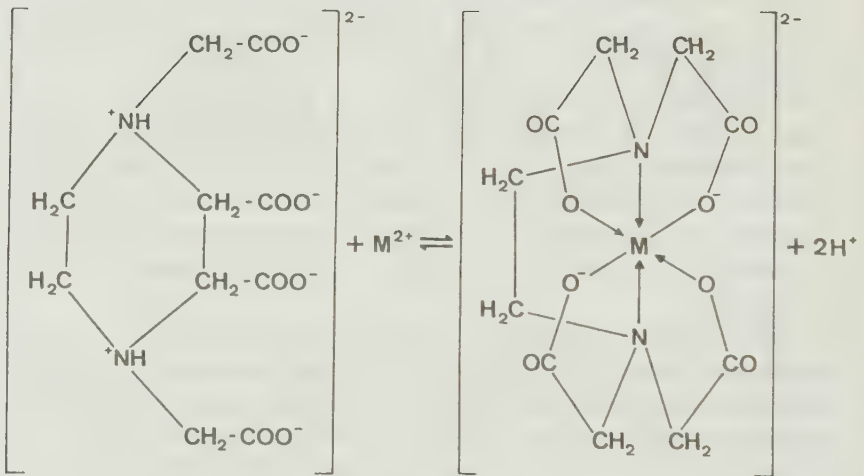
In der Arbeit von HECHTEL wurde die Hemmbarkeit der Paraoxonase durch EDTA in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Trotz geringfügiger Unterschiede zwischen den drei Gruppen fiel die Aktivität bei allen ab einer Konzentration von $6,9 \cdot 10^{-6} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ EDTA im Ansatz ab, um bei einer EDTA-Konzentration von $6,9 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ jeweils ein Aktivitätsminimum von ca. $25 - 50 \frac{\text{U}}{\text{l}}$ zu erreichen, die sogenannte "Restaktivität" der Paraoxonase.

Als Restaktivität bezeichnet man definitionsgemäß die nach EDTA-Zugabe verbleibende Paraoxonase-Aktivität. Sie ist konstant und läßt sich auch durch weitere EDTA-Zugabe nicht mehr absenken (HECHTEL, 1980).

Die hemmende Wirkung von EDTA beruht auf Ca^{++} -Entzug. Es ist in der Lage, in neutraler oder alkalischer Lösung mit zweifach geladenen Kationen Me^{++} einen 1 : 1-Komplex zu bilden, wobei zwei H^{+} -Ionen frei werden (siehe Abbildung 4).

Abbildung 4:

Schematische Darstellung der Bildung eines EDTA-Komplexes



M = Metall

In der vorliegenden Arbeit soll nun geprüft werden, ob und wie weit sich die Paraoxonase nach Hemmung mit EDTA wieder reaktivieren läßt. Bezugsgröße für die Reaktivierbarkeit ist jeweils die Ausgangsaktivität des ungehemmten Enzyms.

Die naheliegendste Möglichkeit der Reaktivierung ist Zugabe von Ca^{++} in verschiedenen Konzentrationen. Auch mit anderen Metallionen müßte man reaktivieren können, nämlich mit solchen, die mit EDTA einen stabileren Komplex bilden als Ca^{++} , deren Komplexbildungskonstante also größer ist. Sie verdrängen das Ca^{++} aus dem EDTA-Komplex. Hier besteht aber die Möglichkeit, daß der Komplexbildner selbst mit dem Enzym in Wechselwirkung tritt, im günstigen Fall als Aktivator, im ungünstigen als Hemmer.

Neben der grundsätzlichen Frage der Reaktivierbarkeit muß geklärt werden, ob man das Serum vor einer Reaktivierung beliebig lange mit EDTA inkubieren kann, oder ob ein zeitlicher Zusammenhang besteht zwischen EDTA-Zugabe und Möglichkeit der Reaktivierung. Weiter ist zu prüfen, ob sich Unterschiede ergeben in der Reaktivierbarkeit der drei Paraoxonase-Typen.

Die Einteilung der Seren bezüglich ihrer Paraoxonase-Aktivität erfolgte nach GELDMACHER - v. MALLINCKRODT und Mitarbeiter (1979):

niedrige Aktivität	77,0 - 118,0	$\frac{U}{I}$
mittlere Aktivität	169,0 - 278,0	$\frac{U}{I}$
hohe Aktivität	352,8 - 623,5	$\frac{U}{I}$

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN:

1. Blutentnahme:

Mittels einer EDTA-Monovette^R von Sarstedt wird den Probanden das Blut aus der Ellenbeuge entnommen. Nach dem Zentrifugieren (20 Minuten bei $2000 \frac{U}{min}$) friert man das gewonnene Serum¹⁾ in Portionen zu je 0,2 ml ein.

2. Metallionen zur Reaktivierung der Paraoxonase:

Zur Reaktivierung der Paraoxonase wurden ausgewählt:

a) Ca^{++} -Ionen als direkter Ersatz der von EDTA im Komplex gebundenen Ca^{++} -Ionen

und

b) Metallionen, deren Komplexbildungskonstante pK größer ist als die von Ca^{++} ($pK = 10,70$):

Mg^{++}	$pK = 8,69$
Mn^{++}	$pK = 13,79$
Fe^{++}	$pK = 14,33$
Al^{+++}	$pK = 16,13$
Zn^{++}	$pK = 16,50$
Cu^{++}	$pK = 18,80$
Fe^{+++}	$pK = 25,1$

(aus JANDER, G., E. BLASIUS: Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum)

1) Wenn in dieser Arbeit von "Serum" gesprochen wird, so geschieht das nur mit Rücksicht auf die Literaturangaben, in denen das Enzym immer als "Serum-Paraoxonase" beschrieben wird. Strenggenommen müßte es "Plasma" heißen, da durch das Zentrifugieren des Blutes nur dessen feste Bestandteile abgetrennt werden, nicht jedoch auch das Fibrin.

Das Magnesium wurde aufgrund seiner Nachbarschaft zu Calcium im Periodensystem der Elemente in diese Liste aufgenommen; es kann vielleicht selbst in Wechselwirkung mit der Paraoxonase treten.

Man muß noch beachten, daß Mangan, Kupfer und Zink als Hemmer der menschlichen Serumpa oxonase beschrieben sind (MENZEL, 1978).

Die Konzentrationen der entsprechenden Metallsalzlösungen ergeben sich aus dem EDTA-Gehalt des eingefrorenen Serums:

Die EDTA-Monovetten, mit denen das Blut abgenommen wird, enthalten pro ml Blut 1,0 mg EDTA, d. h. die 10 ml fassende Monovette enthält 10 mg EDTA, was etwa $3,42 \cdot 10^{-5}$ mol EDTA entspricht ($M_{\text{EDTA}} = 292,25$). Nimmt man an, daß das gesamte EDTA im Serum gelöst ist, und daß man pro Monovette 5 ml Serum gewinnen kann, so beträgt die EDTA-Konzentration $3,42 \cdot 10^{-5}$ mol in 5,0 ml Serum. Dies entspricht einer molaren Konzentration von $6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$.

Die Konzentrationen der wäßrigen Metallsalzlösungen entsprechen dieser Konzentration (äquimolare Lösungen) oder sind ganzzahlige Vielfache davon. Somit kann man jeweils mit 0,2 ml von einer der Reaktivierungslösungen 0,2 ml Serum reaktivieren.

3. Methodik:

Zur Bestimmung der Aktivität der menschlichen Serum-Para oxonase wurde der photometrische Test von KRISCH (1968) herangezogen: Im Meßansatz wird die Zunahme von p-Nitrophenol gemessen, das aus Paraoxon abgespalten wird.

3.1. Reagenzien:

- Glycin-Natronlauge-Puffer nach Sörensen, pH 11,2
- Tris-HCl-Puffer, pH 8,0
- 0,9 %ige Kochsalzlösung
- E 600 Stammlösung
- E 600 Gebrauchslösung
- verdünntes Serum
- wäßrige Lösungen von Metallsalzen zur Reaktivierung der Paraoxonase

3.2. Herstellung der Lösungen:

3.2.1. Glycin-Natronlauge-Puffer:

3,784 g Glycin und 2,945 g NaCl ad 900 ml aqua bidest.
Mit 1,0 n NaOH (40,0 g NaOH ad 1,0 l aqua bidest) bei $20 \pm 1^{\circ}$ C auf pH 11,2 bringen, anschließend mit aqua bidest auffüllen auf 1 Liter.

3.2.2. Tris-HCl-Puffer:

12,11 g "Tris" = Trishydroxymethylaminomethan ad 900 ml aqua bidest. Mit (ca. 14 ml) 1,0 n HCl bei $20 \pm 1^{\circ}$ C auf pH 8,0 bringen, anschließend mit aqua bidest auffüllen auf 1 Liter.

3.2.3. 0,9 %ige Kochsalzlösung:

9,0 g NaCl ad 1,0 l aqua bidest.

3.2.4. E 600 Stammlösung:

260 μ l E 600 ad 100 ml Trispuffer.

Um eine homogene Emulsion von E 600 in Wasser zu erreichen, stellt man die Stammlösung in ein Ultraschallbad.

3.2.5. E 600 Gebrauchslösung:

Verdünnung der E 600 Stammlösung 1 : 5 mit aqua bidest.

3.2.6. Serumverdünnung:

Das in Portionen zu 0,2 ml eingefrorene Serum wird zur Messung 1 : 5 verdünnt mit 0,9 %iger Kochsalzlösung.

3.2.7. Wäßrige Metallsalzlösungen zur Reaktivierung der Para-oxonase:

Als Metallsalze wurden die Chloride gewählt. Die Konzentrationen ihrer wäßrigen Lösungen betragen - wie auf Seite 15 dargelegt - $6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ oder ganzzahlige Vielfache davon.

Von jeder Lösung wurden 50 ml hergestellt. Dazu löste man folgende Mengen in aqua bidest zu jeweils 50 ml einer Metallsalzlösung:

$6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Ca}^{++}$	50,31 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
$2 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Ca}^{++}$	100,62 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
$3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Ca}^{++}$	150,93 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
$6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Mg}^{++}$	69,57 mg $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
$6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Mn}^{++}$	67,72 mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
$6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Fe}^{++}$	68,03 mg $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
$6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Al}^{+++}$	45,63 mg AlCl_3 (rein)
$6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Zn}^{++}$	46,63 mg ZnCl_2 (rein)
$6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Cu}^{++}$	58,33 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
$6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Fe}^{+++}$	92,49 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

3.3. Messung:

Die benötigten Reagenzien werden zunächst im Wasserbad auf 25° C gebracht.

- a) Sodann verdünnt man zur Messung von Ausgangs- und Restaktivitäten jeweils 0,2 ml Serum mit 0,8 ml 0,9 %iger Kochsalzlösung.

- b) Für die Reaktivierungsversuche versetzt man 0,2 ml Serum mit jeweils 0,2 ml von einer der Reaktivierungslösungen und inkubiert zwischen einer halben Stunde und einem Tag bei 25° C. Unmittelbar vor Meßbeginn wird mit 0,9 %iger Kochsalzlösung auf 1 : 5 verdünnt (0,2 ml Serum + 0,8 ml Verdünnung. Die Verdünnung des Serums setzt sich hier zusammen aus den 0,2 ml Reaktivierungslösung + 0,6 ml physiologischer Kochsalzlösung).

Als Meßansatz werden nacheinander in ein Reagensglas pipettiert

1,65 ml Glycin-Puffer

0,25 ml Serumverdünnung

0,5 ml E 600 Gebrauchslösung zum Start der Reaktion

Nach dem Durchmischen wird der Meßansatz in eine 1 cm-Küvette gegeben, die ins Photometer gestellt wird. Bei 25° C, pH 11,2 und der Wellenlänge 405 nm liest man 30 Sekunden und 180 Sekunden nach dem Start der Reaktion die Extinktion des durch Hydrolyse freigesetzten p-Nitrophenol ab. Die sich ergebende Extinktionsdifferenz E 180 Sekunden minus E 30 Sekunden muß noch mit dem Leerwert korrigiert werden. Als Leerwert dient ein entsprechender Meßansatz wie oben angegeben, wobei anstelle von Serum 0,9 %ige Kochsalzlösung verwendet wird.

Pro Reaktivierungsversuch mißt man drei Ansätze und bildet den Mittelwert.

3.4. Berechnung:

Als Enzymaktivität bezeichnet man definitionsgemäß den Quotient aus Substratumsatz pro Zeiteinheit unter Standardbedingungen (Temperatur, pH, Substratsättigung). Ihre Einheit ist $1 \frac{\mu\text{mol Substrat}}{\text{min}} = 1 \text{ U}$.

Die Zeiteinheit beträgt in unserem Fall 180 Sekunden minus 30 Sekunden, also 2,5 Minuten.

Der Substratumsatz läßt sich aus der Extinktionsdifferenz ΔE berechnen.

$$\Delta E = \Delta c \cdot \epsilon_{405} \cdot d$$

$$\text{mit } \Delta c = \frac{\text{mol Substratumsatz}}{\text{Volumen Meßansatz}}$$

$$\begin{aligned} \epsilon_{405} &= \text{molarer Extinktionskoeffizient von} \\ &\text{p-Nitrophenol in Glycinpuffer} \\ &\text{pH 11,2 bei } 405 \text{ nm. Sein Wert ist} \\ &18,05 \cdot 10^6 \frac{\text{cm}^2}{\text{mol}} = 18,05 \cdot 10^3 \frac{1}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \end{aligned}$$

$$d = 1 \text{ cm, Schichtdicke der Küvette}$$

Die Enzymaktivität der Paraoxonase im Meßansatz läßt sich somit nach folgender Formel berechnen:

$$\begin{aligned} A &= \frac{\Delta E \cdot \text{Volumen Meßansatz}}{\Delta t \cdot \epsilon_{405} \cdot d} = \\ &= \Delta E \frac{2,4 \text{ ml}}{2,5 \text{ min} \cdot 18,05 \cdot 10^3 \frac{1}{\text{mol} \cdot \text{cm}} \cdot 1 \text{ cm}} \\ &= \Delta E \cdot \frac{2,4}{2,5 \cdot 18,05} \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \end{aligned}$$

Rechnet man hoch auf 1 l Serum, so kommt man auf eine Aktivität von $\Delta E \cdot \frac{2,4}{2,5 \cdot 18,05} \text{ U} \cdot \frac{1}{0,05 \cdot 10^{-3} \text{ l}}$

$\text{Aktivität} = \Delta E \cdot 1063 \frac{\text{U}}{\text{l Serum}}$
--

4. Versuche zur Reaktivierung der menschlichen Serumparaoxonase:

Sowohl die Versuche mit den verschieden konzentrierten Calcium-Lösungen als auch mit den anderen Metallionen, den "Komplexbildnern", liefen in zwei aufeinanderfolgenden Phasen ab.

Zunächst wurden anhand eines Serums mit mittlerer Paraoxonase-Aktivität ($AA = 175 \frac{U}{l}$) alle im Rahmen der Arbeit möglichen Reaktivierungsversuche durchgeführt. Die wenig erfolgversprechenden Methoden konnten danach ausgeschlossen werden.

Anschließend wurden die zwei oder drei besten Möglichkeiten auf neun weitere Seren angewendet, um eventuelle Gesetzmäßigkeiten festzustellen. Die Seren verteilten sich auf alle drei Paraoxonase-Gruppen, wobei die Zuordnung nach der Einteilung von Seite 13 vorgenommen wurde.

Tabelle 2 enthält die Seren aller Probanden, angeordnet nach steigender Paraoxonase-Ausgangsaktivität (AA).

Tabelle 2:

Paraoxonase-Ausgangsaktivitäten (AA) aller verwendeten Seren in $\frac{U}{I}$

	Serum	AA ($\frac{U}{I}$)
niedriger Typ	Serum A	75
	Serum B	89
	Serum C	96
	Serum D	97
	Serum E	104
mittlerer Typ	Serum F	172
	Serum G	175
hoher Typ	Serum H	297
	Serum I	360
	Serum J	420

4.1. Reaktivierung mittels Calcium-Lösungen:

4.1.1. Reaktivierung eines Serums (Serum G) mit Ca^{++} -Lösungen:

Ausgangsaktivität (AA) : $175 \frac{U}{I}$

Restaktivität (RA) : $55 \frac{U}{I}$

4.1.1.1. Zeitlicher Verlauf der Reaktivierungsversuche mit verschieden konzentrierten Ca^{++} -Lösungen:

Das Serum war jeweils 16 Stunden lang mit EDTA inkubiert. Während dieser Zeit stand es im Kühlschrank,

um eine Denaturierung der Paraoxonase so weit als möglich zu vermeiden.

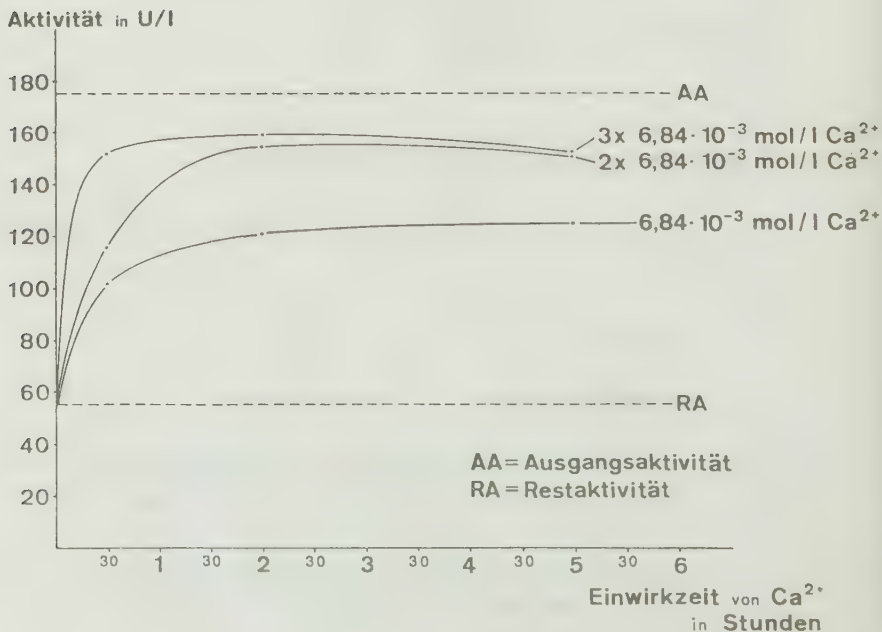
Nach Ablauf der 16 Stunden wurde mit einer der drei Ca^{++} -Lösungen ($6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$, $2 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ und $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ Ca^{++}) reaktiviert und das Serum ins 25°C warme Wasserbad gestellt. Gemessen wurde in der Regel 1/2 Stunde, zwei Stunden und fünf Stunden nach Ca^{++} -Zugabe.

Ergebnisse:

Die Ergebnisse sind graphisch in Abbildung 5 dargestellt.

Abbildung 5:

Zeitlicher Verlauf der Reaktivierung von Serum G mit verschieden konzentrierten Ca^{++} -Lösungen



Im Einzelnen ergab sich folgendes:

- a) Die Ergebnisse der Reaktivierungsversuche mit $2 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ Ca^{++} - und $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ Ca^{++} -Lösungen waren im Prinzip gleich. Der jeweilige Endwert von ca. $155 \frac{\text{U}}{\text{l}}$ entspricht knapp 90 % der Ausgangsaktivität. Er wurde bei $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ Ca^{++} schon nach einer halben Stunde erreicht, während die $2 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ Ca^{++} -Lösung zwei Stunden benötigte.
- b) Längere Inkubation mit Ca^{++} -Lösungen (22 - 24 Stunden im Wasserbad bei 25°C) brachte keine besseren Ergebnisse.
- c) Bei den Versuchen mit $2 \times$ - und $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ Ca^{++} -Lösungen bildete sich im Laufe der Zeit Fibrin als Zeichen für das Vorliegen freier Ca^{++} -Ionen im Meßansatz.

4.1.1.2. Reaktivierung der Paraoxonase in Abhängigkeit von der Einwirkzeit des EDTA:

Die Inkubationszeiten des Serums mit EDTA bewegten sich zwischen "Null" (Reaktivierung und Messung sofort nach der Blutentnahme) und 88 Stunden. Das Serum stand während dieser Zeit wie immer im Kühlschrank.

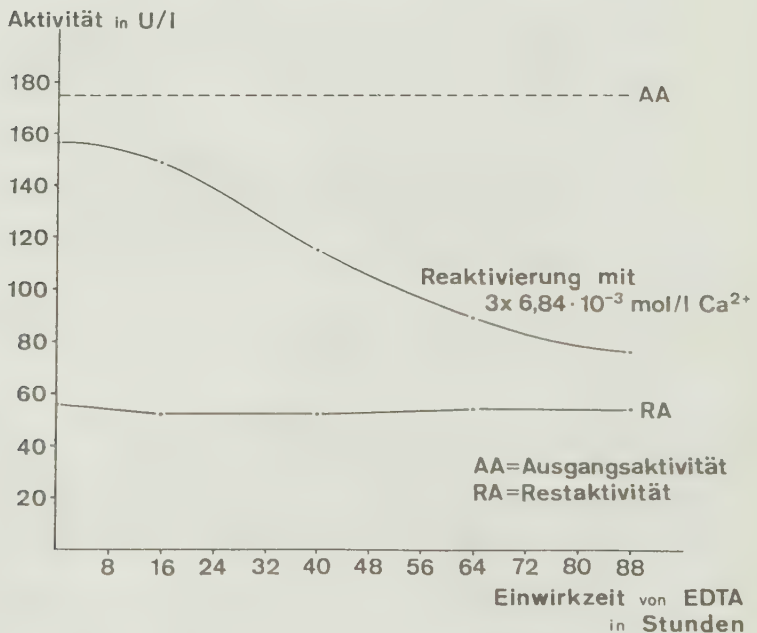
Die Reaktivierung wurde jeweils mit $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ Ca^{++} -Lösung durchgeführt; Messung eine halbe Stunde nach Ca^{++} -Zugabe.

Ergebnisse:

Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 graphisch dargestellt.

Abbildung 6:

Reaktivierung von Serum G mit $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Ca}^{++}$
in Abhängigkeit von der Einwirkzeit des EDTA



Es ließ sich zeigen:

- a) Allein die Zugabe von EDTA denaturiert einen gewissen Prozentsatz Enzym (hier ca. 10 %) irrever-

sibel. Auch durch sofortige Ca^{++} -Zugabe ist die Ausgangsaktivität nicht mehr zu erreichen.

- b) Die Möglichkeit der Reaktivierung hängt ab von der Dauer des Ca^{++} -Entzuges: Je länger das EDTA einwirken kann, desto weniger läßt sich das Enzym reaktivieren, desto mehr ist also irreversibel denaturiert.

Die Abhängigkeit ist nicht linear.

- c) Die sogenannte Restaktivität, d. h. die nach EDTA-Zugabe verbleibende Paraoxonase-Aktivität (siehe S. 11), fiel nur geringfügig ab. Der entscheidende Faktor für die Denaturierung der Paraoxonase scheint tatsächlich der Ca^{++} -Entzug zu sein, da die nicht Ca^{++} -abhängige Enzymfraktion weitgehend unbeeinflusst blieb.

- d) Die Kurve für die Reaktivierung nähert sich asymptotisch einem Wert, der bei ca. $70 \frac{\text{U}}{\text{I}}$ liegt.

4.1.1.3. Reaktivierungsversuche bei höherer Temperatur:

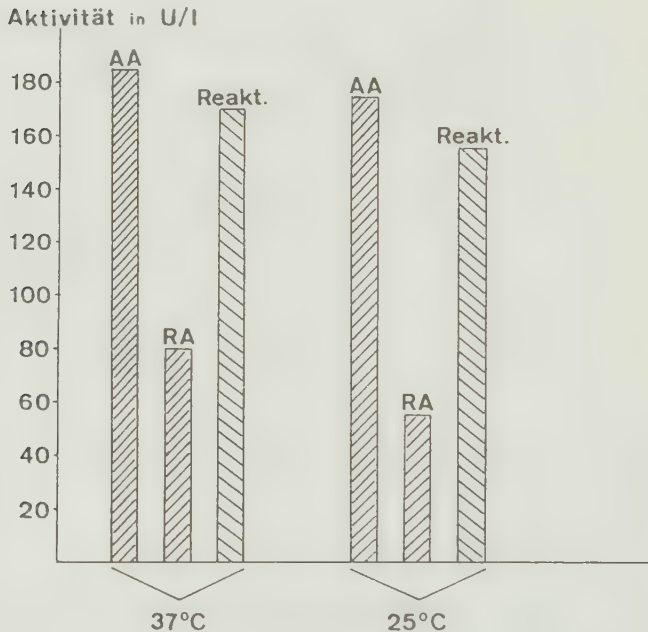
Statt wie bisher bei 25°C wurde das Serum G nun bei 37°C mit $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{I}} \text{Ca}^{++}$ -Lösung reaktiviert. Es war vorher 16 Stunden lang mit EDTA inkubiert. Die Messung erfolgte eine halbe Stunde nach Ca^{++} -Zugabe bei 37°C .

Ergebnisse:

In Abbildung 7 ist das Ergebnis graphisch dargestellt. Zum Vergleich sind die Werte für die entsprechenden Messungen bei der Standardtemperatur 25°C daneben aufgetragen.

Abbildung 7:

Vergleich Reaktivierung von Serum G mit
 $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Ca}^{++}$ bei 25°C und bei 37°C



AA=Ausgangsaktivität

RA=Restaktivität

Reakt.=erreichter Wert bei der Reaktivierung mit
 $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \text{mol/l Ca}^{2+}$ -Lösung

Es zeigt sich, daß bei 37°C sowohl Ausgangsaktivität (AA) und Restaktivität (RA) als auch der erreichte Wert bei der Reaktivierung mit $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Ca}^{++}$ (Reakt.) gegenüber den Messungen bei 25°C erhöht sind. Da jedoch die Restak-

tivität die größte Aktivitätssteigerung erfuhr, liegt die Vermutung nahe, daß vor allem die nicht Ca^{++} -abhängige Enzymfraktion durch die höhere Temperatur in ihrer Aktivität gesteigert wurde. Temperatursteigerung hat also wenig Sinn.

4.1.2. Reaktivierung der Seren aller zehn Probanden mit $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l Ca}^{++}$:

In den Versuchen mit Serum G hatte sich herausgestellt, daß die Reaktivierungsversuche mit der $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Ca}^{++}$ -Lösung die besten Ergebnisse zeigten (siehe Abbildung 5, S. 22). Aus diesem Grund wurden nun die Reaktivierungsversuche mit den anderen neun Seren (siehe Tabelle 2, S. 21) nur auf die $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Ca}^{++}$ -Lösung beschränkt. Die beiden anderen Ca^{++} -Lösungen ($6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Ca}^{++}$ und $2 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Ca}^{++}$) wurden nicht berücksichtigt.

In den folgenden Graphiken sind die Werte für das Serum G der Vollständigkeit halber mit aufgeführt.

4.1.2.1. Reaktivierung mit $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Ca}^{++}$ -Lösung:

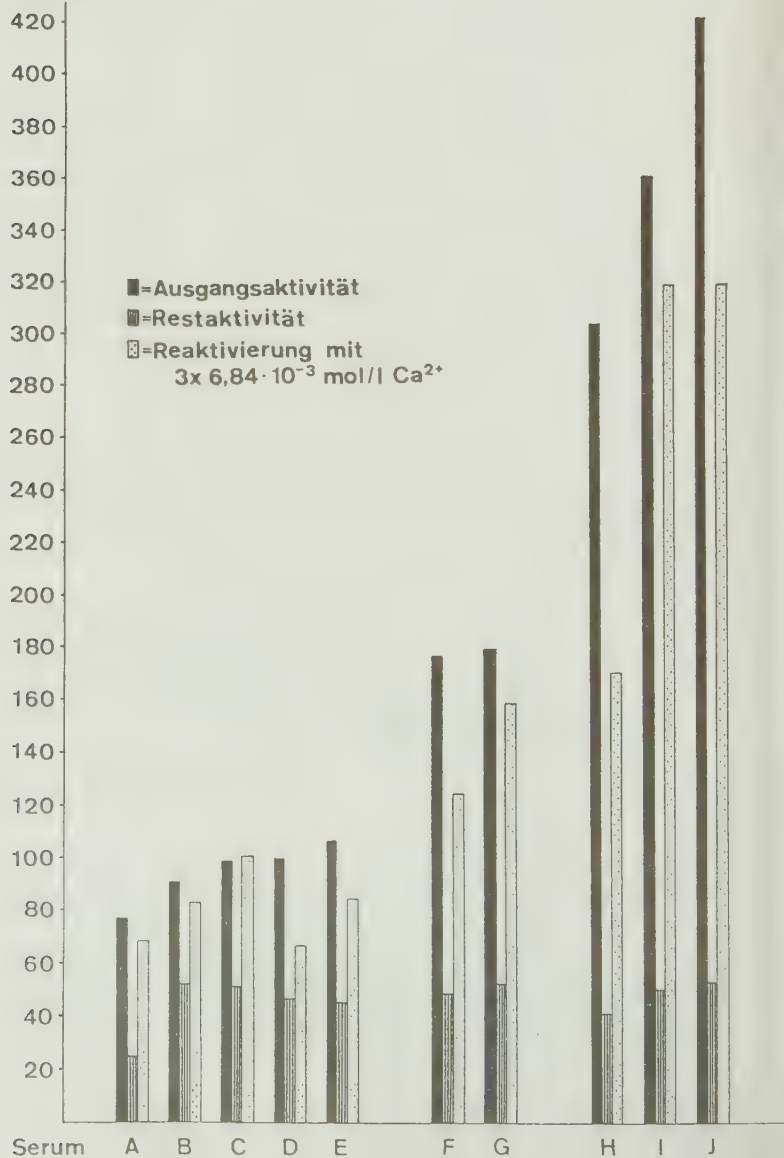
Die Seren waren jeweils 16 Stunden lang mit EDTA inkubiert, bevor mit der $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Ca}^{++}$ -Lösung reaktiviert wurde. Messung eine halbe Stunde nach Ca^{++} -Zugabe.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 graphisch dargestellt.

Abbildung 8:

Reaktivierung der Seren aller zehn Probanden mit $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Ca}^{++}$ -Lösung nach 16-stündiger Inkubation mit EDTA

Aktivität in U/l



Die Anordnung der einzelnen Seren auf der Abszisse erfolgte gemäß der Einteilung von Tabelle 2, S. 21, nach steigender Ausgangsaktivität. Die Balken bedeuten jeweils von links nach rechts:

- 1.) Ausgangsaktivität
- 2.) Restaktivität nach 16 Stunden Inkubation mit EDTA
- 3.) Aktivität nach Reaktivierung mit
 $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Ca}^{++}$

Im Einzelnen ergab sich:

- a) Seren mit niedriger Ausgangsaktivität scheinen weniger empfindlich gegen Ca^{++} -Entzug zu sein als jene mit hoher, da sie sich besser reaktivieren lassen. Bezugspunkt ist die Ausgangsaktivität des jeweiligen Serums.
- b) Der entscheidende Faktor für die Reaktivierung eines Serums ist jedoch offensichtlich eine individuelle Komponente, da man auch innerhalb einer Gruppe - z. B. der mit niedriger Ausgangsaktivität - keine generelle Aussage treffen kann, wieviel Prozent der Ausgangsaktivität man durch die Reaktivierung erreichen wird.

4.1.2.2. Reaktivierung der Seren aller zehn Probanden in Abhängigkeit von der Einwirkzeit des EDTA:

Die Inkubationszeiten der Seren mit EDTA bewegten sich zwischen "Null" (Reaktivierung und Messung sofort nach der Blutabnahme) und 88 Stunden. Während dieser Zeit befanden sich die Seren im Kühlschrank. Die Reaktivierung wurde jeweils mit $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ Ca^{++} -Lösung durchgeführt; Messung eine halbe Stunde nach Ca^{++} -Zugabe.

Um die Graphik übersichtlicher gestalten zu können, wurde sie zweigeteilt: In Abbildung 9 a werden die Seren mit hoher und mittlerer Paraoxonase-Ausgangsaktivität dargestellt, während 9 b die Darstellung der fünf Seren mit niedriger Ausgangsaktivität beinhaltet.

Abbildung 9 a:

Reaktivierung der Seren mit hoher und mittlerer Ausgangsaktivität in Abhängigkeit von der Einwirkzeit des EDTA

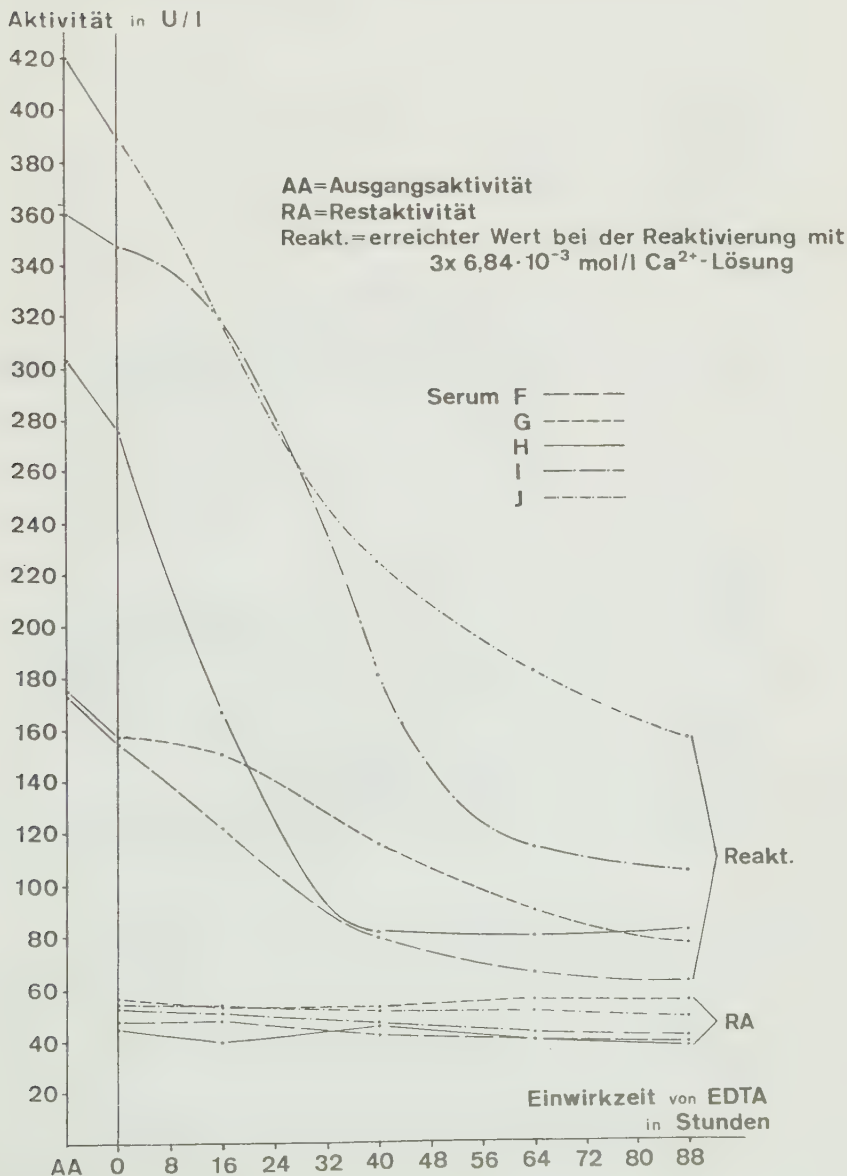
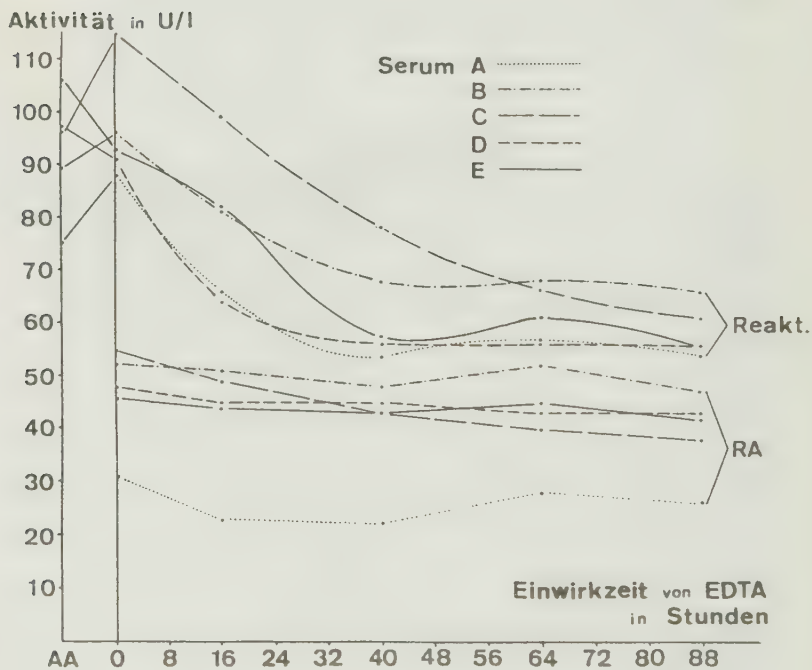


Abbildung 9 b:

Reaktivierung der Seren mit niedriger Ausgangsaktivität in Abhängigkeit von der Einwirkzeit des EDTA



AA=Ausgangsaktivität

RA=Restaktivität

Reakt.=erreichter Wert bei der Reaktivierung mit
 $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l Ca}^{2+}$ -Lösung

Im Einzelnen ergab sich folgendes:

- a) Wie schon auf Seite 29 festgestellt, reagieren die Seren mit mittlerer und hoher Paraoxonase-Ausgangsaktivität empfindlicher auf Ca^{++} -Entzug als die Seren mit niedriger Ausgangsaktivität.
- b) Die Werte für die Reaktivierung nach 88 Stunden Inkubation mit EDTA bewegen sich zwischen $55 \frac{\text{U}}{\text{I}}$ und $150 \frac{\text{U}}{\text{I}}$, wobei keine eindeutige Beziehung besteht zwischen Ausgangsaktivitäten und diesen "88-Stunden-Werten".

4.2. Reaktivierung mittels anderer Metallionen:

4.2.1. Reaktivierung eines Serums (Serum G) mit sieben weiteren Metallionen:

Ausgangsaktivität (AA) : $175 \frac{\text{U}}{\text{I}}$

Restaktivität (RA) : $55 \frac{\text{U}}{\text{I}}$

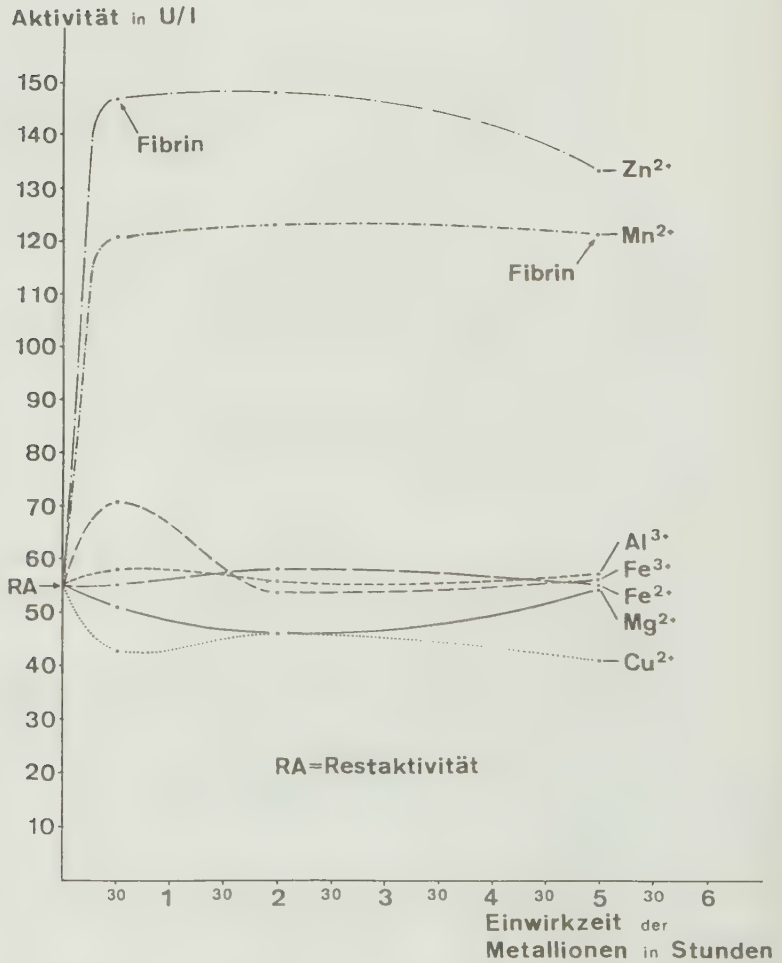
Das Serum wurde jeweils 16 Stunden lang mit EDTA inkubiert. Während dieser Zeit befand es sich im Kühlschrank.

Nach Ablauf der 16 Stunden wurde mit einer der sieben Metallionenlösungen ($6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Me}^{n+}$, siehe S. 17) reaktiviert und das Serum ins 25°C warme Wasserbad gestellt. Gemessen wurde eine halbe Stunde, zwei Stunden und fünf Stunden nach Beginn der Reaktivierung.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 graphisch dargestellt.

Abbildung 10:

Zeitlicher Verlauf der Reaktivierung von Serum G mit verschiedenen Metallionen



Es konnte gezeigt werden:

- a) Die besten Resultate wurden mit den Zn^{++} - und Mn^{++} -Lösungen erzielt. Bei diesen beiden bildete sich auch jeweils Fibrin im Meßansatz - bei Zn^{++} schon eine halbe Stunde nach Zugabe, bei Mn^{++} erst nach fünf Stunden.

Die Fibrinbildung ist ein Indiz dafür, daß Ca^{++} aus dem EDTA-Komplex freigesetzt wurde.

- b) Bei Kontrollversuchen stellte sich heraus, daß die Mn^{++} -Ionen selbst aktiv sind und Paraoxon katalytisch spalten. Reine Mn^{++} -Lösungen ($6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Mn}^{++}$) täuschten Paraoxonase-Aktivitäten zwischen $21 \frac{\text{U}}{\text{l}}$ und $109 \frac{\text{U}}{\text{l}}$ vor. Die Werte der Reaktivierungen mit Mn^{++} sind also zu hoch.

Alle übrigen Metallsalzlösungen verhalten sich Paraoxon gegenüber neutral, d. h. sie selbst spalten nicht.

- c) Bei den Versuchen mit Cu^{++} und vor allem mit Zn^{++} , beides Hemmer der Paraoxonase (MENZEL, 1978) beobachtet man nach fünf Stunden einen Aktivitätsabfall.

Obwohl MENZEL auch das Mn^{++} als Hemmer der Paraoxonase beschrieben hat, konnte hier ähnliches nicht festgestellt werden.

4.2.2. Reaktivierung aller zehn Seren mittels Zn^{++} und Mn^{++} :

Wie schon gesagt, wurden die besten Resultate mit den $6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ Zn^{++} - und Mn^{++} -Lösungen erzielt. Aus diesem Grund wurden nur diese beiden für die Reaktivierungsversuche mit den restlichen neun Seren herangezogen.

Die Seren waren wieder jeweils 16 Stunden lang mit EDTA inkubiert, bevor durch Zugabe der $6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ Zn^{++} - bzw. Mn^{++} -Lösung die Reaktivierung gestartet wurde. Gemessen wurde eine halbe Stunde, zwei Stunden und fünf Stunden nach Zn^{++} - bzw. Mn^{++} -Zugabe.

Die Werte für das Serum G sind der Vollständigkeit halber in den Abbildungen 11 und 12 wieder mit aufgeführt. Der Anfangspunkt jeder Kurve ist die Restaktivität des jeweiligen Serums nach 16-stündiger Inkubation mit EDTA. Am Ende jeder Kurve ist die Ausgangsaktivität (AA) angegeben.

Abbildung 11:

Zeitlicher Verlauf der Reaktivierung aller zehn Seren mit Mn^{++}

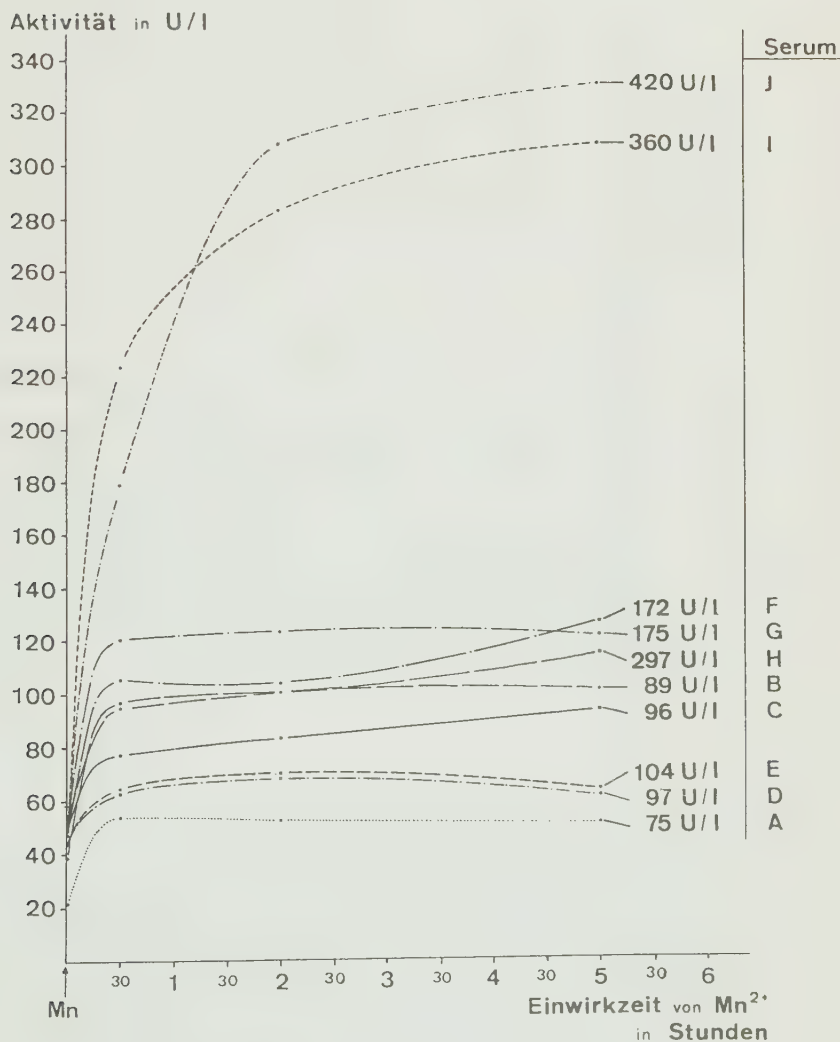
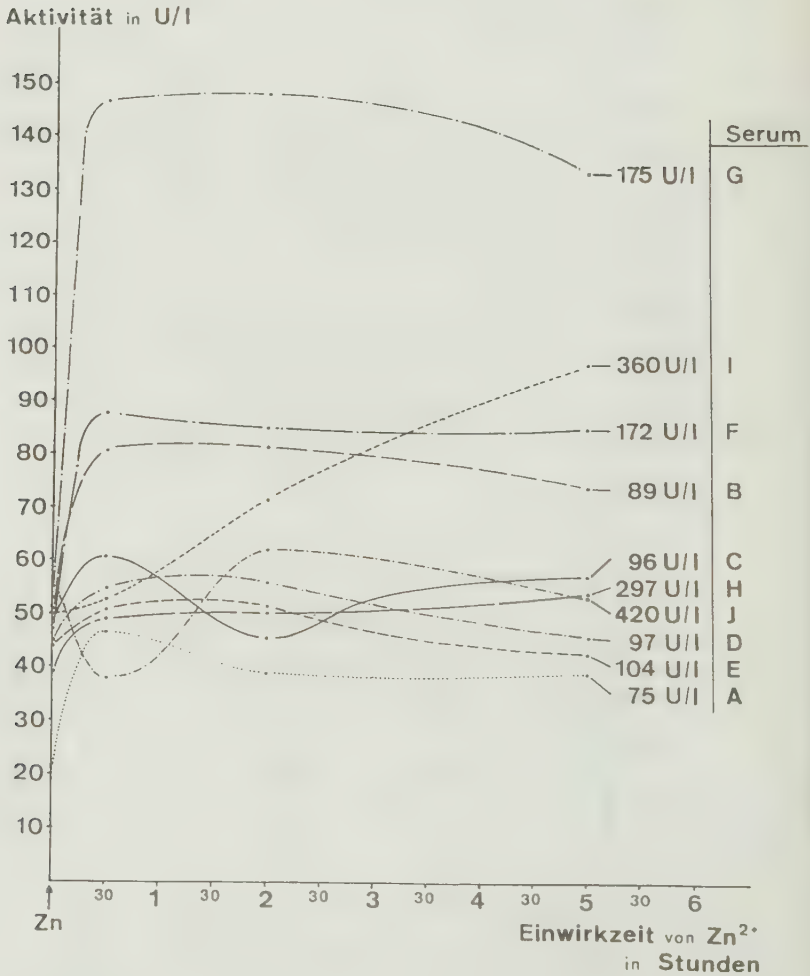


Abbildung 12:

Zeitlicher Verlauf der Reaktivierung aller zehn Seren mit Zn^{++}



Ergebnisse:

a) Zink:

Die Reaktion auf die Zugabe des starken Hemmers Zn^{++} (MENZEL, 1978) scheint vor allem von individuellen Faktoren der Seren bestimmt zu sein. Ob die hemmende Wirkung des Zn^{++} zum Tragen kommt (z. B. Serum H), oder ob die vom Zn^{++} freigesetzten Ca^{++} -Ionen eine Reaktivierung bewirken (z. B. Serum G), läßt sich von vornherein nicht sagen. Auffallend ist lediglich, daß die Seren mit hoher Paraoxonase-Ausgangsaktivität nach Inkubation mit Zn^{++} unverhältnismäßig stärker in ihrer Aktivität abfallen als die Seren mit niedriger und mittlerer Ausgangsaktivität.

Diese Anfälligkeit der Seren mit hohen Aktivitäten konnte schon bei den Versuchen mit der $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Ca}^{++}$ -Lösung beobachtet werden (siehe Abbildung 9 a, b), nur trat sie dort nicht so offensichtlich zutage, wie sie das hier bei den Versuchen mit Zn^{++} tut.

Den beobachteten starken Aktivitätsabfall bei Inkubation mit Zn^{++} kann man eventuell auch als zusätzliches Trennungskriterium verwenden zwischen Seren mit hohen Ausgangsaktivitäten einerseits und Seren mit mittleren und niedrigen Ausgangsaktivitäten andererseits.

b) Mangan:

Bei den Reaktivierungsversuchen mit Mn^{++} (Abbildung 11) fällt nur auf, daß die Seren I und J sehr hohe Werte erreichen. Inwieweit hier die Mn^{++} -Ionen eine Rolle spielen, die ja bekanntlich selbst Paraoxon spalten (siehe S. 35), läßt sich nur sehr schwer sagen. Aussagekraft haben bei diesen Versuchen mit Mn^{++} also nicht die Absolutwerte der erreichten Aktivitäten, sondern - mit Vorbehalt - nur die relativ zu den anderen Seren erreichte Reaktivierung.

5. Weitere Untersuchungen:

5.1. Sofortige Ca^{++} -Zugabe nach der Blutentnahme:

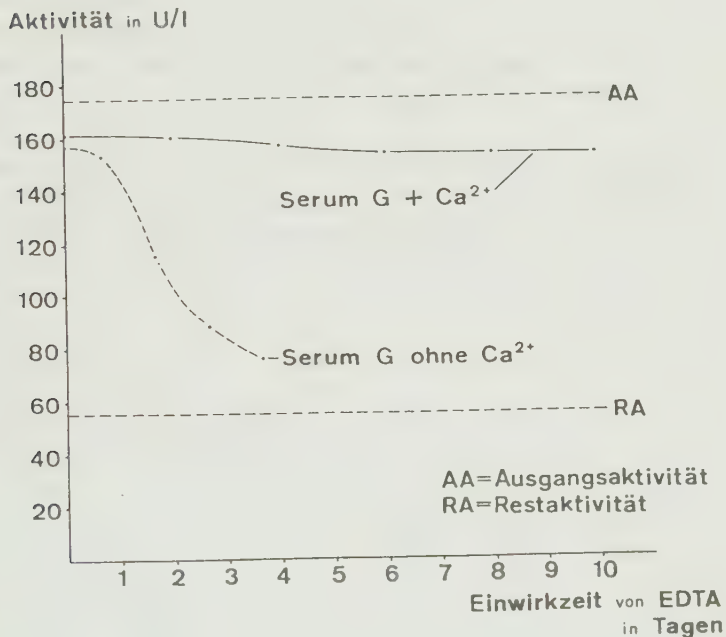
Einem Serum - in diesem Fall Serum G - wird sofort nach der Blutabnahme $2 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ Ca^{++} -Lösung zugegeben. Die bei der Blutabnahme einsetzende EDTA-Wirkung auf das Serum, nämlich Ca^{++} -Mangel, wird sofort wieder durch die Ca^{++} -Zugabe rückgängig gemacht.

Wie man aus Abbildung 13 ansehen kann, bleibt die Aktivität des mit Ca^{++} versetzten Serums über einen Beobachtungszeitraum von zehn Tagen hinweg konstant bei etwa $155 - 160 \frac{\text{U}}{\text{l}}$. Ähnliche Beobachtungen hatte schon HECHTEL (1980) gemacht; sie bezeichnete die zugegebenen Ca^{++} -Ionen aus diesem Grund als "Schutzfaktor" für die Paraoxonase.

Zum Vergleich ist die Reaktivierungskurve des selben Serums (Serum G) eingezeichnet, dem nach der Blutabnahme die Ca^{++} -Ionen nicht zugegeben wurden, wo also die EDTA-Wirkung über den gesamten Zeitraum voll einsetzen konnte. Dieses Serum wurde jeweils eine halbe Stunde vor Meßbeginn mit $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ Ca^{++} reaktiviert (gestrichelte Kurve).

Abbildung 13:

Vergleich der Aktivität von Serum G mit und ohne Ca^{++} über einen Zeitraum von zehn Tagen



Ergebnis:

Wie die beiden Kurven zeigen, wird die Denaturierung der Paraoxonase offenbar allein durch den Ca^{++} -Mangel bewirkt, da die beiden Serumgruppen ansonsten gleiche Versuchsbedingungen hatten. Die Anwesenheit von Ca^{++} scheint die Paraoxonase auch über einen längeren Zeitraum hinweg (hier zehn Tage) zu stabilisieren.

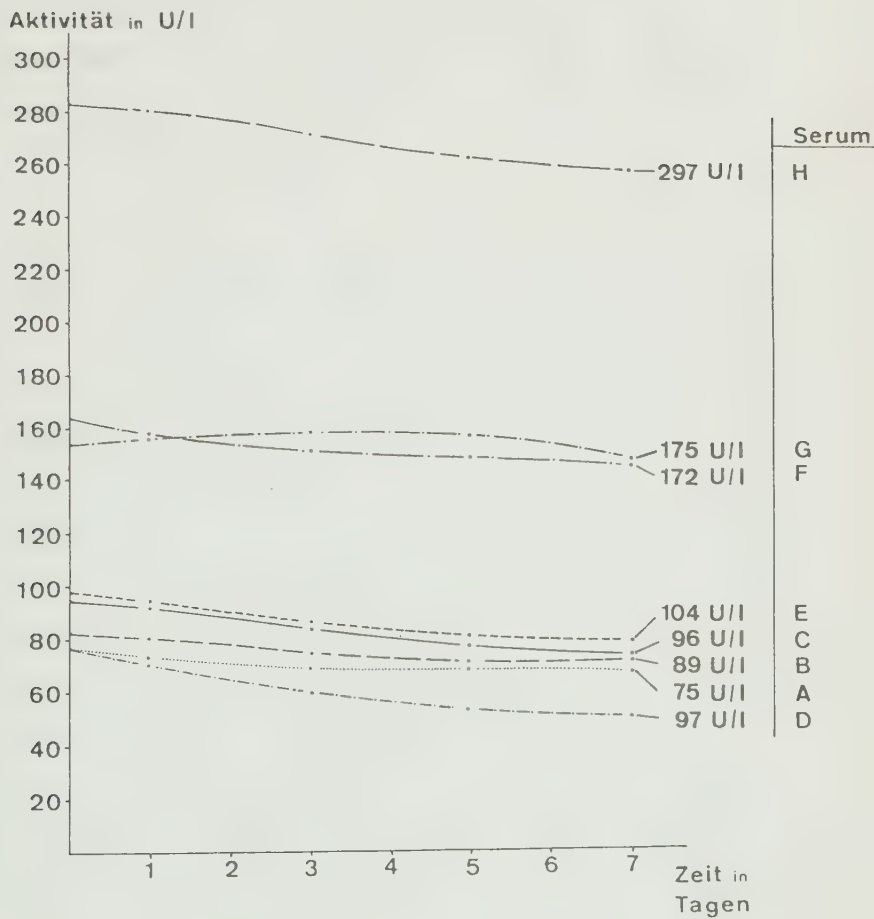
5.2. Verwendung von Heparin statt EDTA als Gerinnungshemmer:

In einem weiteren Versuch wurde als Gerinnungshemmer statt EDTA Heparin verwendet, dessen Wirkung nicht auf Ca^{++} -Entzug basiert. Heparin bindet sich als prosthetische Gruppe an ein α_2 -Globulin, das sogenannte Antithrombin II/III, und inaktiviert in dieser Form vor allem das Thrombin, so daß der Mechanismus der Blutgerinnung hier unterbrochen wird.

Abbildung 14 zeigt die Aktivitäten der mit Heparin versetzten Seren über einen Zeitraum von sieben Tagen, gerechnet vom Zeitpunkt der Blutabnahme. Am Ende jeder Kurve ist die Ausgangsaktivität des jeweiligen Serums angegeben.

Abbildung 14:

Paraoxonase-Aktivität bei Verwendung von Heparin als Gerinnungshemmer



Ergebnis:

Abgesehen von einem initialen Aktivitätsverlust bleiben die Aktivitäten relativ konstant. Ihre Werte bewegen sich knapp unterhalb der jeweiligen Ausgangsaktivitäten, die am Ende der Kurven angegeben sind. Das geringfügige Absinken der Aktivitäten im Laufe der Zeit läßt sich mit der durchaus physiologischen Alterung der Proteine erklären.

IV. DISKUSSION:

Die besten Resultate bei der Reaktivierung der Paraoxonase wurden mit der $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Ca}^{++}$ -Lösung erzielt, die wohl als Mittel der Wahl betrachtet werden muß. Mit ihr waren nicht nur die Absolutwerte der erreichten Aktivitäten am höchsten, sondern sie erlaubten - vor allem bei den Seren mit niedriger und mittlerer Aktivität - auch Rückschlüsse auf die Ausgangsaktivität (siehe Abbildung 8). Das Serum darf dabei nicht länger als 16 Stunden mit EDTA versetzt sein, sonst ist zu viel Enzym irreversibel denaturiert.

Die $6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Zn}^{++}$ - und Mn^{++} -Lösungen enttäuschten in dieser Hinsicht. Wie die Abbildungen 11 und 12 zeigen, besteht hier keinerlei Zusammenhang zwischen der Ausgangsaktivität und dem erreichten Wert bei der Reaktivierung. Bei den Versuchen mit Zn^{++} fiel auf, daß die Seren mit hohen Paraoxonase-Ausgangsaktivitäten einen unverhältnismäßig stärkeren Aktivitätsabfall zeigten als die Seren mit niedrigen oder mittleren Ausgangsaktivitäten. Diese Tatsache könnte ein weiteres Trennungskriterium sein zwischen den Paraoxonase-Gruppen I und II (niedrige und mittlere Aktivität) einerseits und III (hohe Aktivität) andererseits (siehe S. 10 und S. 13).

Die Versuche mit Mn^{++} sind insofern mit Vorsicht zu betrachten, als Mn^{++} selbst Paraoxon spaltet. Messungen reiner Mn^{++} -Lösungen ($6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}} \text{Mn}^{++}$) ergaben bei gleichen Meßzeiten Aktivitäten zwischen $21 \frac{\text{U}}{\text{l}}$ und $109 \frac{\text{U}}{\text{l}}$; der Anteil ist somit nicht unerheblich! Die fünf neben Zn^{++} und Mn^{++} untersuchten Komplexbildner Mg^{++} , Fe^{++} , Al^{3+} , Cu^{++} und Fe^{3+} waren nicht in der Lage, die Paraoxonase zu reaktivieren.

Unabhängig von der gewählten Reaktivierungslösung konnte noch gezeigt werden, daß die Möglichkeit der Reaktivierung der Paraoxonase offensichtlich abhängig ist von der Dauer

des Ca^{++} -Entzuges, also von der Inkubationszeit mit EDTA. Wie die Abbildungen 6 und 9 a, b zeigen, fallen die Aktivitäten mit zunehmender Einwirkzeit des EDTA stark ab. Dabei scheinen die Seren mit höherer Ausgangsaktivität empfindlicher auf den Ca^{++} -Entzug zu reagieren als jene mit niedriger. Dieser Punkt bedürfte jedoch noch einer Klärung mit einer repräsentativen Anzahl von Probanden. Die untersuchten zehn Seren lassen wohl grundsätzliche Aussagen zu, eine Statistik kann man mit ihnen nicht aufstellen.

Die These, daß die Reaktivierung der Paraoxonase abhängig ist von der Inkubationszeit mit EDTA, wird noch durch die Versuche untermauert, bei denen sofort nach Blutentnahme die EDTA-Wirkung aufgehoben wurde durch Zugabe von Ca^{++} (Abbildung 13). Die Paraoxonase-Aktivitäten blieben über einen Zeitraum von zehn Tagen in etwa konstant.

Auch bei Verwendung von Heparin statt EDTA als Gerinnungshemmer fiel die Paraoxonase-Aktivität über einen Zeitraum von einer Woche nicht ab (Abbildung 14). Man kann also sagen, daß sowohl die sofortige Zugabe von Ca^{++} zu dem vom Vollblut abgetrennten Serum (reines Serum kann nicht mehr gerinnen, weil ihm das letzte Glied in der Gerinnungskette, das Fibrin, fehlt) als auch die Verwendung von Gerinnungshemmern, die nicht auf der Basis von Ca^{++} -Entzug arbeiten (z. B. Heparin) Lösungsmöglichkeiten sein könnten für das Problem der irreversiblen Denaturierung der Paraoxonase durch den Ca^{++} -Entzug bei EDTA-Zugabe.

V. ZUSAMMENFASSUNG:

Die Reaktivierung der menschlichen Serumparaoxonase nach Hemmung mit EDTA ist in erster Linie davon abhängig, wie lange dem Enzym die zu seiner Funktionsfähigkeit notwendigen Ca^{++} -Ionen entzogen werden. Je länger man das Humanserum mit EDTA inkubiert, desto geringer sind die jeweils erreichten Enzymaktivitäten bei den Reaktivierungsversuchen. Ca^{++} -Mangel scheint das Enzym Paraoxonase mit fortschreitender Dauer zu einem immer größeren Prozentsatz irreversibel zu denaturieren.

Hebt man den Ca^{++} -Mangel des mit EDTA versetzten Serums durch Zugabe einer $2 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ Ca^{++} -Lösung sofort nach der Blutentnahme auf, oder verwendet man Gerinnungshemmer, die nicht auf der Basis von Ca^{++} -Entzug arbeiten (z. B. Heparin), so fällt die Aktivität der Serumparaoxonase während des Kontrollzeitraumes (7 - 10 Tage) nicht ab.

An Reaktivierungslösungen wurden untersucht verschieden konzentrierte Ca^{++} -Lösungen ($6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ Ca^{++} , $2 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ Ca^{++} und $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ Ca^{++}) einerseits und Lösungen von Zn^{++} -, Mn^{++} -, Mg^{++} -, Fe^{++} -, Al^{3+} -, Cu^{++} - und Fe^{3+} -Ionen (jeweils $6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$) andererseits, die als starke Komplexbildner die Ca^{++} -Ionen aus dem Komplex mit EDTA wieder freisetzen sollten. Die besten Ergebnisse wurden mit der $3 \times 6,84 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mol}}{\text{l}}$ Ca^{++} -Lösung erzielt.

VI. LITERATURVERZEICHNIS:

1. ALDRIDGE, W. N.:
Serum Esterases. 1. Two types of esterase (A and B) hydrolysing p-nitrophenyl acetate, propionate and butyrate, and a method for their determination.
Biochem. J. 52, 110 (1953 a)
2. ALDRIDGE, W. N.:
Serum Esterases. 2. An enzyme hydrolysing diethyl p-nitrophenyl phosphate (E 600) and its identity with the A-esterase of mammalian sera.
Biochem. J. 52, 117 (1953 b)
3. DUMBACH, J.:
Statistische Analyse zur Genetik der menschlichen Serumparaoxonase (E. C. 3.1.1.2.).
Dissertation Erlangen 1976
4. ERDÖS, E. G. and L. E. BOGGS:
Hydrolysis of paraoxon in mammalian blood.
Nature 190, 716 (1961)
5. ERDÖS, E. G., C. R. DEBAY and M. P. WESTERMANN:
Activation and inhibition of the arylesterase of human serum.
Nature 184, 430 (1959)
6. ERDÖS, E. G., C. R. DEBAY and M. P. WESTERMANN:
Arylesterases in blood: Effect of calcium and inhibitors.
Biochem. Pharmacol. 5, 173 (1960)
7. FORTH, W., D. HENSCHLER, W. RUMMEL:
Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.
Bibliographisches Institut, Mannheim, Wien, Zürich (1980)

8. GELDMACHER - v. MALLINCKRODT, M., U. RABAST,
H. H. LINDORF:
Unterschiedliche Reaktion menschlicher Serum-Cholin-
esterasen mit E 600 (O,O-Diäthyl-O-(p-nitrophenyl-)phos-
phat).
Arch. Toxikol. 25, 223 (1969 a)
9. GELDMACHER - v. MALLINCKRODT, M., H. J. URBACH,
H. KITTEL, H. H. LINDORF:
Zur Messung der in vivo- und in vitro-Reaktivierbarkeit
alkylphosphatvergifteter Serumcholinesterase durch 2-PAM
und Toxogin mit verschiedenen Substraten.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 7, 480 (1969 b)
10. GELDMACHER - v. MALLINCKRODT, M., H. H. LINDORF,
M. PÈTÈNYI, M. FLÜGEL, TH. FISCHER, TH. HILLER:
Genetisch determinierter Polymorphismus der menschlichen
Serum-Paraoxonase (E. C. 3.1.1.2.).
Humangenetik 17, 331 (1973 a)
11. GELDMACHER - v. MALLINCKRODT, M., M. PÈTÈNYI, H. METZNER,
H. BURGIS, B. DIETZEL, H. NIRSCHL, O. RENNER:
Zur Spezifität der menschlichen Serum-Paraoxonase.
Z. Physiol. Chem. 354, 337 (1973 b)
12. GELDMACHER - v. MALLINCKRODT, M., G. HOMMEL, J. DUMBACH:
On the genetics of human serum paraoxonase
(E. C. 3.1.1.2.).
Human genetics 50, 313 - 326 (1979)
13. HARTL, W.:
Untersuchungen über den Einfluß steigender Ca^{++} Konzen-
trationen im menschlichen Serum auf die Aktivität der
Serum-Paraoxonase.
Dissertation Erlangen 1978

14. HECHEL, R.:
Die Hemmung der menschlichen Serumparaoxonase durch
EDTA.
Dissertation Erlangen 1980
15. JANDER, G., E. BLASIUS:
Einführung in das anorganisch-chemische Praktikum.
Verlag S. Hirzel, Stuttgart (1968)
16. KRISCH, K.:
Enzymatische Hydrolyse von Diäthyl-p-nitrophenylphosphat
(E 600) durch menschliches Serum.
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 6, 41 (1968)
17. MAIN, A. R.:
The purification of the enzyme hydrolysing diethyl p-ni-
trophenyl phosphate (paraoxon) in sheep serum.
Biochem. J. 74, 10 (1960 a)
18. MAIN, A. R.:
The differentiation of the A-type esterase in sheep se-
rum.
Biochem. J. 75, 188 (1960 b)
19. MARTON, A. V. and W. KALOW:
Inhibitors of aromatic esterase of human serum.
Biochem. Pharmacol. 3, 149 (1960)
20. MENZEL, W.:
Die Serum-Arylesterasen (EC 3.1.1.2.) in der Literatur
von 1942 bis 1971.
Dissertation Erlangen 1978
21. WELLHÖNER, H. H.:
Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikolo-
gie.
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1976)

DANKSAGUNG:

Besonders herzlich danke ich Frau Professor Dr. Dr. M. Geldmacher - v. Mallinckrodt für die Überlassung des Themas, für ihre große Hilfsbereitschaft und die zu jeder Zeit freundlich erteilten Ratschläge.

Herrn Professor Dr. H.-B. Wuermeling, Vorstand des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Erlangen-Nürnberg, danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Lebenslauf

Am 22. Januar 1958 wurde ich, Werner Günter Heinrich, in Abensberg (Niederbayern) als Sohn des Schreiners Horst Heinrich und seiner Ehefrau Frieda, geb. Dietl, geboren. Mein Glaubensbekenntnis ist römisch-katholisch.

An Schulausbildung kann ich nachweisen:

4 Jahre Grundschule von 1964 bis 1968 in der
Volksschule Abensberg.

9 Jahre Gymnasium von 1968 bis 1977 am
Donau-Gymnasium Kelheim.
Reifeprüfung im Mai 1977.

Zum Sommersemester 1978 nahm ich an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen das Studium der Zahnmedizin auf und legte vor dem dortigen Prüfungsausschuß im März 1979 die naturwissenschaftliche Vorprüfung, im September 1980 die zahnärztliche Vorprüfung und im Juli 1983 die zahnärztliche Prüfung ab.

Erteilung der Approbation als Zahnarzt am 17. August 1983.

Ich bin ledig und wohne bei meinen Eltern in Abensberg, Uhlandstr. 2.

Abensberg, den 01.09.1983

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197